



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 18 964 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
C 07 D 401/12
C 07 D 209/42
A 61 K 31/40

⑦ Aktenzeichen: 198 18 964.8
② Anmeldetag: 28. 4. 98
③ Offenlegungstag: 4. 11. 99

DE 198 18 964 A 1

⑦① Anmelder:
Arzneimittelwerk Dresden GmbH, 01445 Radebeul,
DE

⑦② Erfinder:
Höfgen, Norbert, Dr., 01458 Medingen, DE;
Egerland, Ute, 01445 Radebeul, DE; Poppe,
Hildegard, Dr., 01109 Dresden, DE; Marx,
Degenhard, Dr., 01796 Pirna, DE; Szelenyi, Stefan,
Prof., 90571 Schwaig, DE; Kronbach, Thomas, Dr.,
01445 Radebeul, DE; Polymeropoulos, Emmanuel,
Dr., 60325 Frankfurt, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE	196 36 150 A1
DE	195 11 916 A1
US	54 24 329
EP	07 73 024 A2
WO	98 08 818 A1
WO	98 02 151 A2
WO	97 48 697 A1
WO	95 24 408 A1
WO	95 14 667 A1
WO	94 12 461 A1

The Merck Index, MERCK & Co., Inc., Rahway, N.J.,
U.S.A., 1989, S.786;

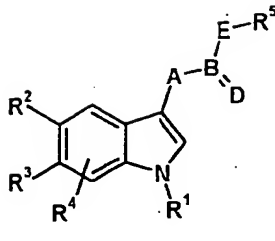
Chemical Abstracts:

Vol.114, 1991, Ref. 240174a;
Vol.121, 1994, Ref. 81303t;
Vol.127, 1997, Ref. 108841e;
Vol.127, 1997, Ref. 219990x;
Vol.117, 1992, Ref. 225926r;
Vol.121, 1994, Ref. 2861x;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Neue Hydroxyindole, deren Verwendung als Inhibitoren der Phosphodiesterase 4 und Verfahren zu deren Herstellung
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft neue Hydroxyindole, deren Verwendung als Inhibitoren der Phosphodiesterase 4 und Verfahren zu deren Herstellung.

DE 198 18 964 A 1



1

worin

R¹, R⁵ für -C_{1...12}-Alkyl, geradkettig oder verzweigt, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NHC_{1...6}-Alkyl, -N(C_{1...6}-Alkyl)₂, -NHC_{6...14}Aryl, -N(C_{6...14}Aryl)₂, -N(C_{1...6}Alkyl)(C_{6...14}Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C_{1...6}-Alkyl, -O-C_{6...14}-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C_{1...6}-Alkyl, -S-C_{6...14}-Aryl, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C_{1...6}-Alkyl, -OSO₂C_{6...14}-Aryl, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, wobei die C_{6...14}-Aryl-Gruppen und die eingeschlossenen carbocyclischen und heterocyclischen Substituenten ihrerseits ggf. ein- oder mehrfach mit R⁴ substituiert sein können.

-C_{1...12}-Alkenyl, ein oder mehrfach ungesättigt, geradkettig oder verzweigt, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NHC_{1...6}-Alkyl, -N(C_{1...6}-Alkyl)₂, -NHC_{6...14}Aryl, -N(C_{6...14}Aryl)₂, -N(C_{1...6}Alkyl)(C_{6...14}Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C_{1...6}-Alkyl, -O-C_{6...14}-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C_{1...6}-Alkyl, -S-C_{6...14}-Aryl, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C_{1...6}-Alkyl, -OSO₂C_{6...14}-Aryl, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, wobei die C_{6...14}-Aryl-Gruppen und die eingeschlossenen carbocyclischen und heterocyclischen Substituenten ihrerseits ggf. ein- oder mehrfach mit R⁴ substituiert sein können.

-mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NHC_{1...6}-Alkyl, -N(C_{1...6}-Alkyl)₂, -NHC_{6...14}Aryl, -N(C_{6...14}Aryl)₂, -N(C_{1...6}Alkyl)(C_{6...14}Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C_{1...6}-Alkyl, -O-C_{6...14}-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C_{1...6}-Alkyl, -S-C_{6...14}-Aryl, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C_{1...6}-Alkyl, -OSO₂C_{6...14}-Aryl, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, wobei die C_{6...14}-Aryl-Gruppen und die eingeschlossenen carbocyclischen und heterocyclischen Substituenten ihrerseits ggf. ein- oder mehrfach mit R⁴ substituiert sein können.

-mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NHC_{1...6}-Alkyl, -N(C_{1...6}-Alkyl)₂, -NHC_{6...14}Aryl, -N(C_{6...14}Aryl)₂, -N(C_{1...6}Alkyl)(C_{6...14}Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C_{1...6}-Alkyl, -O-C_{6...14}-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C_{1...6}-Alkyl, -S-C_{6...14}-Aryl, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C_{1...6}-Alkyl, -OSO₂C_{6...14}-Aryl, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, wobei die C_{6...14}-Aryl-Gruppen und die eingeschlossenen carbocyclischen und heterocyclischen Substituenten ihrerseits ggf. ein- oder mehrfach mit R⁴ substituiert sein können.

-carbo- oder heterocyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Spirocyclen mit 3...10 Ringgliedern, wobei heterocyclische Systeme 1...6 Heteroatome enthalten, die vorzugsweise N, O und S sind, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NHC_{1...6}-Alkyl, -N(C_{1...6}-Alkyl)₂, -NHC_{6...14}Aryl, -N(C_{6...14}Aryl)₂, -N(C_{1...6}Alkyl)(C_{6...14}Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C_{1...6}-Alkyl, -O-C_{6...14}-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C_{1...6}-Alkyl, -S-C_{6...14}-Aryl, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C_{1...6}-Alkyl, -OSO₂C_{6...14}-Aryl, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, wobei die C_{6...14}-Aryl-Gruppen und die eingeschlossenen carbocyclischen und heterocyclischen Substituenten ihrerseits ggf. ein- oder mehrfach mit R⁴ substituiert sein können.

steht, wobei R¹ und R⁵ gleich oder verschieden sein können

R², R³ können Wasserstoff oder -OH sein, wobei mindestens einer von beiden Substituenten -OH sein muß;

R⁴ steht für -H, -OH, -SH, -NH₂, -NHC_{1...6}-Alkyl, -N(C_{1...6}-Alkyl)₂, -NHC_{6...14}Aryl, -N(C_{6...14}Aryl)₂, -N(C_{1...6}Alkyl)(C_{6...14}Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -COOH, -(CO)R⁶, -(CS)R⁶, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C_{1...6}-Alkyl, -O-C_{6...14}-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C_{1...6}-Alkyl, -S-C_{6...14}-Aryl, -SOR⁶, -SO₂R⁶.

R⁶ kann -H, -NH₂, -NHC_{1...6}-Alkyl, -N(C_{1...6}-Alkyl)₂, -NHC_{6...14}Aryl, -N(C_{6...14}Aryl)₂, -N(C_{1...6}Alkyl)(C_{6...14}Aryl), -O-C_{1...6}-Alkyl, -O-C_{6...14}-Aryl, -S-C_{1...6}-Alkyl, -S-C_{6...14}-Aryl, -C_{1...12}-Alkyl, geradkettig oder verzweigt, -C_{1...12}-Alkenyl, ein oder mehrfach ungesättigt, geradkettig oder verzweigt, -mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, -mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, bedeuten.

abhängigkeit bei wiederholtem Einsatz von Analgetika, wie beispielsweise Morphin sowie zur Verringerung der Toleranzentwicklung beim wiederholten Einsatz von diesen Analgetika verwendet werden.

Zur Herstellung der Arzneimittel wird neben den üblichen Hilfsmitteln, Träger- und Zusatzstoffen eine wirksame Dosis der erfindungsgemäßen Verbindungen oder deren Salze verwendet. Die Dosierung der Wirkstoffe kann je nach Verabfolgungsweg, Alter, Gewicht des Patienten, Art und Schwere der zu behandelnden Erkrankungen und ähnlichen Faktoren variieren. Die tägliche Dosis kann als einmal zu verabreichende Einzeldosis oder unterteilt in 2 oder mehrere Tagesdosen gegeben werden und beträgt in der Regel 0,001–100 mg.

Als Applikationsform kommen orale, parenterale, intravenöse, transdermale, topische, inhalative und intranasale Zubereitungen in Frage.

Zur Anwendung kommen die üblichen galenischen Zubereitungsformen wie Tabletten, Dragees, Kapseln, dispergierbare Pulver, Granulate, wäßrige Lösungen, wäßrige oder ölige Suspensionen, Sirup, Säfte oder Tropfen.

Feste Arzneiformen können inerte Inhalts- und Trägerstoffe enthalten, wie z. B. Calciumcarbonat, Calciumphosphat, Natriumphosphat, Lactose, Stärke, Mannit, Alginate, Gelatine, Guar-Gummi, Magnesium- oder Aluminiumstearat, Methylcellulose, Talkum, hochdisperse Kieselsäuren, Silikonöl, höhermolekulare Fettsäuren (wie Stearinsäure), Gelatine, Agar-Agar oder pflanzliche oder tierische Fette und Öle, feste hochmolekulare Polymere (wie Polyethylenglykol); für orale Applikation geeignete Zubereitungen können gewünschtenfalls zusätzliche Geschmacks- und/oder Süßstoffe enthalten.

Flüssige Arzneiformen können sterilisiert sein und/oder gegebenenfalls Hilfsstoffe wie Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Netzmittel, Penetrationsmittel, Emulgatoren, Spreitmittel, Lösungsvermittler, Salze, Zucker oder Zuckeralkohole zur Regelung des osmotischen Drucks oder zur Pufferung und/oder Viskositätsregulatoren enthalten. Derartige Zusätze sind zum Beispiel Tartrat- und Citrat-Puffer, Ethanol, Komplexbildner (wie Ethylendiamin-tetraessigsäure und deren nicht-toxische Salze). Zur Regelung der Viskosität kommen hochmolekulare Polymere in Frage wie beispielsweise flüssiges Polyethylenoxid, mikrokristalline Cellulosen Carboxymethylcellulosen, Polyvinylpyrrolidone, Dextrane oder Gelatine. Feste Trägerstoffe sind zum Beispiel Stärke, Lactose, Mannit, Methylcellulose, Talkum, hochdisperse Kieselsäuren, höhermolekulare Fettsäuren (wie Stearinsäure), Gelatine, Agar-Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette, feste hochmolekulare Polymere wie Polyethylenglykol.

Ölige Suspensionen für parenterale oder topische Anwendungen können vegetabile synthetische oder semisynthetische Öle wie beispielsweise flüssige Fettsäureester mit jeweils 8 bis 22 C-Atomen in den Fettsäureketten, zum Beispiel Palmitin-, Laurin-, Tridecyl-, Margarin-, Stearin-, Arachin-, Myristin-, Behen-, Pentadecyl-, Linol-, Elaidin-, Brasin-, Eruca- oder Ölsäure, die mit ein- bis dreiwertigen Alkoholen mit 1 bis 6 C-Atomen wie beispielsweise Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Pentanol oder deren Isomere, Glycerol oder Glycerol verestert sind, sein. Derartige Fettsäureester sind beispielsweise handelsübliche Miglyole, Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, Isopropylstearat, PEG 6-Caprin-säure, Capryl/Caprin-säureester von gesättigten Fettalkoholen, Polyoxyethylenglyceroltrioleat, Ethyloleat, wachsartige Fettsäureester wie künstliches Entenbürzeldrüsenfett, Kokosfetsäure-isopropylester, Ölsäureoleylester, Ölsäuredecylester, Milchsäureethylester, Dibutylphthalat, Adipinsäurediisopropylester, Polyol-Fettsäureester u. a. Ebenso geeignet sind Silikonöle verschiedener Viskosität oder Fettalkohole wie Isotridexylalkohol, 2-Octyldodecanol, Cetylstearyl-Alkohol oder Oleylalkohol, Fettsäuren wie beispielsweise Ölsäure. Weiterhin können vegetabile Öle wie Rizinusöl, Mandelöl, Olivenöl, Sesamöl, Baumwollsaatöl, Erdnußöl oder Sojabohnenöl Verwendung finden.

Als Lösungsmittel, Gelbildner und Lösungsvermittler kommen in Frage Wasser oder mit Wasser mischbare Lösungsmittel. Geeignet sind zum Beispiel Alkohole wie beispielsweise Ethanol oder Isopropylalkohol, Benzylalkohol, 2-Octyldodecanol, Polyethylenglykole, Phthalate, Adipate, Propylenglykol, Glycerin, Di- oder Tripropylenglykol, Wachse, Methylcellosolve, Cellosolve, Ester, Morpholine, Dioxan, Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Tetrahydrofuren, Cyclohexanon etc.

Als Filmbildner können Celluloseether verwendet werden, die sich sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln lösen bzw. anquellen können, wie beispielsweise Hydroxypropylmethylcellulose, Methylcellulose, Ethylcellulose oder lösliche Stärken.

Mischformen zwischen Gel- und Filmbildnern sind durchaus ebenfalls möglich. Hier kommen vor allem ionische Makromoleküle zur Anwendung, wie z. B. Natriumcarboxymethylcellulose, Polyacrylsäure, Polymethacrylsäure und deren Salze, Natriumamyllopektinsemiglykolat, Alginsäure oder Propylenglykol-Alginat als Natriumsalz, Gummi arabicum, Xanthan-Gummi, Guar-Gummi oder Carrageenan. Als weitere Formulierungshilfsmittel können eingesetzt werden: Glycerin, Paraffin unterschiedlicher Viskosität, Triethanolamin, Collagen, Allantoin, Novantisäure. Auch die Verwendung von Tensiden, Emulgatoren oder Netzmitteln kann zur Formulierung notwendig sein, wie z. B. von Na-Laurylsulfat, Fettalkoholethersulfaten, Di-Na-N-lauryl- β -iminodipropionat, polyoxyethyliertes Rizinusöl oder Sorbitan-Monooleat, Sorbitan-Monostearat, Polysorbaten (z. B. Tween), Cetylalkohol, Lecithin, Glycerinmonostearat, Polyoxyethylenstearat, Alkylphenolpolyglykolether, Cetyltrimethylammoniumchlorid oder Mono-/Dialkylpolyglykolether-orthophosphorsäure-monoethanolaminsalzen. Stabilisatoren wie Montmorillonite oder kolloidale Kieselsäuren zur Stabilisierung von Emulsionen oder zur Verhinderung des Abbaus der aktiven Substanzen wie Antioxidantien, beispielsweise Tocopherole oder Butylhydroxyanisole, oder Konservierungsmittel, wie p-Hydroxybenzoesäureester, können ebenfalls zur Zubereitung der gewünschten Formulierungen gegebenenfalls erforderlich sein.

Zubereitungen zur parenteralen Applikation können in separaten Dosisformen wie z. B. Ampullen oder Vials vorliegen. Vorzugsweise werden Lösungen des Wirkstoffes verwendet, bevorzugt wässrige Lösungen und vor allem isotonische Lösungen aber auch Suspensionen. Diese Injektionsformen können als Fertigpräparat zur Verfügung gestellt werden oder erst direkt vor der Anwendung durch Mischen der wirksamen Verbindung, zum Beispiel des Lyophilisats, gegebenenfalls mit weiteren festen Trägerstoffen, mit dem gewünschten Lösungs- oder Suspensionsmittel zubereitet werden.

Intranasale Zubereitungen können als wäßrige oder ölige Lösungen bzw. als wäßrige oder ölige Suspensionen vorliegen. Sie können auch als Lyophilisate vorliegen, die vor der Anwendung mit dem geeigneten Lösungs- oder Suspensionsmittel zubereitet werden.

DE 198 18 964 A 1

Beispiel 2

N-(3,5-Dichlorpyridin-4-yl)-2-[1-(4-fluorbenzyl)-5-hydroxy-indol-3-yl]-2-oxo-acetamid (1)

5 g (38 mmol) wasserfreies Aluminiumchlorid werden in 50 ml Ethan-1,2-dithiol vorgelegt. Bei 0°C wird eine Lösung von 4,7 g N-(3,5-Dichlorpyridin-4-yl)-2-[1-(4-fluorbenzyl)-5-methoxy-indol-3-yl]-2-oxo-acetamid (10 mmol) in 50 ml Dichlormethan zugegeben. Das Gemisch wird 4 Stunden bei 0°C gerührt. Unter Rühren werden bei 0–10°C 50 ml 10%ige Salzsäure zugetropft. Das kristallisierende Produkt wird isoliert, mit Wasser gewaschen und bei 20°C getrocknet. Durch Umkristallisation aus Ethanol (180 ml) wird ein reines Produkt erhalten.

Ausbeute: 3,1 g (67% der Theorie),

Schmelzpunkt: 212–214°C.

Exemplarisches Herstellungsverfahren für erfindungsgemäße Verbindungen der Formel 1 aus Ausgangsstoffen der beschriebenen Art, bei denen R¹ eine Acyl-, Alkoxy-carbonyl-, Aryloxy-carbonyl-, Aminocarbonyl-, N-substituierte Aminocarbonyl-, Silyl-, Sulfonyl-Gruppe ist:

Beispiel 3

N-(3,5-Dichlorpyridin-4-yl)-2-[1-(4-fluorbenzyl)-5-hydroxy-indol-3-yl]-2-oxo-acetamid-Na-Salz (2)

5 g N-(3,5-Dichlorpyridin-4-yl)-2-[5-acetoxy-1-(4-fluorbenzyl)-indol-3-yl]-2-oxo-acetamid (10 mmol) werden in 50 ml verdünnter Natronlauge 1 Stunde bei 40–50°C gerührt. Die Lösung wird unter Kühlung mit Eis mit Salzsäure (10%ig) neutralisiert und bis zur Trockene eingedunstet. Der Rückstand wird in 80 ml Aceton gelöst. Unlösliche Bestandteile werden abgetrennt. Die klare Lösung wird mit einer Lösung von 0,4 g NaOH in 3 ml Wasser versetzt und 2 Stunden bei 20°C gerührt. Das kristallisierte Produkt wird isoliert, mit Aceton gewaschen und bei 60°C getrocknet.

Ausbeute: 2,44 g (51% der Theorie),

Schmelzpunkt: 265°C.

Exemplarisches Herstellungsverfahren für erfindungsgemäße Verbindungen der Formel 1 aus anderen erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1:

Beispiel 4

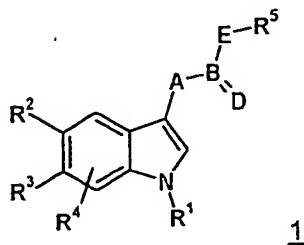
N-(3,5-Dichlorpyridin-4-yl)-2-[1-(4-fluorbenzyl)-5-hydroxy-indol-3-yl]-2-hydroxy-acetamid (3)

1 g N-(3,5-Dichlorpyridin-4-yl)-2-[1-(4-fluorbenzyl)-5-hydroxy-indol-3-yl]-2-oxo-acetamid (1; 2 mmol) werden in 75 ml Methanol suspendiert. Nach Zugabe einer Lösung von 0,2 g Natriumborhydrid in 3 ml verdünnter Natronlauge wird das Reaktionsgemisch 6 Stunden bei 20°C gerührt. Nachdem das Lösungsmittel abdestilliert wurde, wird der Rückstand aus 40 ml Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0,5 g (50% der Theorie),

Schmelzpunkt: 205–207°C.

Unter Verwendung der angegebenen beispielhaften Varianten können zahlreiche weitere Verbindungen der Formel 1 hergestellt werden, von denen folgende beispielhaft angeführt werden:



Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind starke Inhibitoren der Phosphodiesterase 4 und der TNF α Freisetzung. Ihr therapeutisches Potential wird in vivo beispielsweise durch die Hemmung der asthmatischen Späthase-Reaktion (Eosinophilie) am Meerschweinchen sowie durch die Beeinflussung der Allergen-induzierten vaskulären Permeabilität an aktiv sensibilisierten Brown-Norway Ratten belegt.

Inhibition der Phosphodiesterase

Die PDE 4-Aktivität wird in Enzympräparationen aus humanen polymorphkernigen Lymphocyten (PMNL) bestimmt, die PDE 2, 3 und 5-Aktivität mit PDE aus humanen Thrombocyten. Humanes Blut wurde mit Citrat anticoaguliert. Durch eine Zentrifugation bei 700 x g für 20 Minuten bei RT wird das thrombocytenreiche Plasma im Überstand von den Erythrocyten und Leukocyten getrennt. Die Thrombocyten werden durch Ultraschall lysiert und im PDE 3 und PDE 5-Assay eingesetzt. Für die Bestimmung der PDE 2-Aktivität wird die cytosolische Thrombocytenfraktion über einer Anionenaustauschersäule mittels NaCl-Gradienten gereinigt und der PDE 2-Peak wird für den Assay gewonnen. Die PMNLs für die PDE 4-Bestimmung werden durch eine folgende Dextran sedimentation und anschließende Gradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque isoliert. Nach einem zweimaligen Waschen der Zellen werden die noch enthaltenden Erythrocyten durch die Zugabe von 10 ml hypotonischem Puffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH=7,4) innerhalb von 6 Minuten bei 4°C lysiert. Die noch intakten PMNLs werden noch zwei Mal mit PBS gewaschen und mittels Ultraschall lysiert. Der Überstand einer einstündigen Zentrifugation bei 4°C bei 48000 x g enthält die cytosolische Fraktion der PDE 4 und wird für die PDE 4-Messungen eingesetzt.

Die Phosphodiesterase-Aktivität wird mit einigen Modifizierungen nach der von Thompson et al. beschriebenen Methode bestimmt. (Thompson, W. J.; Appleman, M. M., Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the enzyme. Adv. Cycl. Nucl. Res. 1979, 10, 69-92). Die Reaktionsmischungen enthalten 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, die Inhibitoren in variablen Konzentration, die entsprechende Enzympräparation sowie die zur Erfassung der einzelnen Isoenzyme notwendigen weiteren Komponenten (siehe unten). Durch die Zugabe des Substrates 0,5 μ M [³H]-cAMP oder [³H]-cGMP (ca. 6000 CPM/Test) wird die Reaktion gestartet. Das Endvolumen beträgt 100 ml. Testsubstanzen werden als Stammlösungen in DMSO angesetzt. Die DMSO-Konzentration im Reaktionsgemisch ist 1% v/v. Bei dieser DMSO-Konzentration wird die PDE-Aktivität nicht beeinflusst. Nach dem Start der Reaktion mittels Substrat-Zugabe werden die Proben 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch ein Erhitzen der Testtubes für 2 Minuten auf 110°C wird die Reaktion gestoppt. Die Proben bleiben für weitere 10 Minuten im Eis. Nach der Zugabe von 30 μ l 5'-Nukleotidase (1 mg/ml, aus einer Schlangengiftsuspension aus Crotalus adamanteus) erfolgt eine Inkubation für 10 Minuten bei 37°C. Die Proben werden auf Eis abgestoppt, jeweils 400 μ l einer Mischung aus Dowex-Wasser-Ethanol (1+1+1) zugegeben, gut gemixt und wieder 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße werden 20 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. 200 μ l Aliquots des Überstandes werden direkt in Szintillationsgefäße überführt. Nach der Zugabe von 3 ml Szintillator werden die Proben im Betacounter gemessen.

Für die Bestimmung der PDE 4, 3 und 2-Aktivität wird als Substrat [³H]-cAMP, für die Bestimmung der PDE 5-Aktivität [³H]-cGMP verwendet. Die jeweils unspezifischen Enzymaktivitäten werden in Gegenwart von 100 μ M Rolipram bei der PDE 4 und in Gegenwart von 100 μ M IBMX bei der Bestimmung der PDE 3 und 5 ermittelt und von den Testwerten subtrahiert. Die Inkubationsansätze des PDE 3-Assays enthalten 10 μ M Rolipram, um eventuelle Verunreinigungen durch die PDE 4 zu hemmen. Die PDE 2 wird mit einem SPA-Assay der Firma Amersham getestet. In Gegenwart des Aktivators der PDE 2 (5 μ M cGMP) wird der Assay durchgeführt.

Für die erfindungsgemäßen Verbindungen wurden bezüglich der Inhibition der Phosphodiesterase 4 IC₅₀-Werte im Bereich von 10⁻⁹ bis 10⁻⁵ M bestimmt. Die Selektivität gegenüber den PDE-Typen 2, 3 und 5 beträgt Faktor 100 bis 10.000.

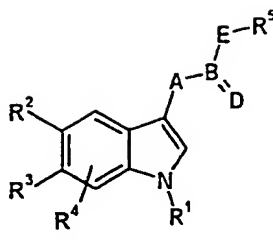
Hemmung der TNF α Freisetzung aus Zellen nasaler Polypen

Die Versuchsanordnung entspricht im wesentlichen der von Campbell, A. M. und Bousquet J. (Anti-allergic activity of H₁-blockers. Int. Arch. Allergy Immunol., 1993, 101, 308-310) beschriebenen Methode. Das Ausgangsmaterial bilden nasale Polypen (OP-Material) von Patienten die sich einer chirurgischen Behandlung unterzogen haben.

Das Gewebe wird mit RPMI 1640 gewaschen und anschließend mit Protease (2,0 mg/ml), Collagenase (1,5 mg/ml), Hyaluronidase (0,75 mg/ml) und DNase (0,05 mg/ml) über 2 h bei 37°C aufgeschlossen (1 g Gewebe auf 4 ml RPMI 1640 mit Enzymen). Die erhaltenen Zellen, eine Mischung aus Epithelzellen, Monozyten, Makrophagen, Lymphocyten, Fibroblasten und Granulozyten, werden filtriert und durch wiederholtes Zentrifugieren in Nährlösung gewaschen, durch Zugabe von humanem IgE passiv sensibilisiert und die Zellsuspension auf eine Konzentration von 2 Mio Zellen/ml in RPMI 1640 (ergänzt mit Antibiotika, 10% fetalem Kälberserum, 2 mM Glutamin und 25 mM Hepes) eingestellt. Diese Suspension wird auf 6-Well-Zellkulturplatten (1 ml/well) verteilt. Die Zellen werden mit den Prüfsubstanzen in verschiedenen Endkonzentrationen 30 min vorinkubiert und anschließend durch Zugabe von Anti-IgE (7,2 μ g/ml) zur TNF α Freisetzung angeregt. Die maximale Freisetzung in das Nährmedium erfolgt nach ca. 18 Stunden. In diesem Zeitraum werden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Nährmedium (Überstand) wird durch Zentrifugation gewonnen (5 min 4000 U/min) und bis zur Zytokinbestimmung bei -70°C gelagert. Die Bestimmung von TNF α im Überstand erfolgt mit sog. Sandwich-ELISAs (Grundmaterial Pharmingen), mit denen Konzentrationen des Zytokins im Bereich von 30-1000 pg/ml nachgewiesen werden können.

Nicht mit Anti-IgE stimulierte Zellen produzieren kaum TNF α , stimulierte Zellen dagegen sezernieren große Mengen an TNF α , was z. B. durch PDE 4 Inhibitoren dosisabhängig vermindert werden kann. Aus der prozentualen Hemmung (TNF α -Freisetzung der mit Anti-IgE stimulierte Zellen = 100%) der geprüften Substanzen bei verschiedenen Konzentrationen wird die IC₅₀ (concentration at 50% inhibition) berechnet.

Für die erfindungsgemäßen Verbindungen wurden IC₅₀-Werte im Bereich von 10⁻⁷ bis 10⁻⁵ M bestimmt.



1

worin

R¹, R⁵ für -C₁...₁₂-Alkyl, geradkettig oder verzweigt, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁...₆-Alkyl, -N(C₁...₆-Alkyl)₂, -NHC₆...₁₄Aryl, -N(C₆...₁₄Aryl)₂, -N(C₁...₆Alkyl)(C₆...₁₄Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁...₆-Alkyl, -O-C₆...₁₄-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C₁...₆-Alkyl, -S-C₆...₁₄Aryl, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁...₆Alkyl, -OSO₂C₆...₁₄Aryl, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, wobei die C₆...₁₄Aryl-Gruppen und die eingeschlossenen carbocyclischen und heterocyclischen Substituenten ihrerseits ggf. ein- oder mehrfach mit R⁴ substituiert sein können,

-C₁...₁₂-Alkenyl, ein oder mehrfach ungesättigt, geradkettig oder verzweigt, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁...₆-Alkyl, -N(C₁...₆-Alkyl)₂, -NHC₆...₁₄Aryl, -N(C₆...₁₄Aryl)₂, -N(C₁...₆Alkyl)(C₆...₁₄Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁...₆-Alkyl, -O-C₆...₁₄-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C₁...₆-Alkyl, -S-C₆...₁₄Aryl, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁...₆Alkyl, -OSO₂C₆...₁₄Aryl, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, wobei die C₆...₁₄Aryl-Gruppen und die eingeschlossenen carbocyclischen und heterocyclischen Substituenten ihrerseits ggf. ein- oder mehrfach mit R⁴ substituiert sein können,

-mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁...₆-Alkyl, -N(C₁...₆-Alkyl)₂, -NHC₆...₁₄Aryl, -N(C₆...₁₄Aryl)₂, -N(C₁...₆Alkyl)(C₆...₁₄Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁...₆-Alkyl, -O-C₆...₁₄-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C₁...₆-Alkyl, -S-C₆...₁₄Aryl, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁...₆Alkyl, -OSO₂C₆...₁₄Aryl, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, wobei die C₆...₁₄Aryl-Gruppen und die eingeschlossenen carbocyclischen und heterocyclischen Substituenten ihrerseits ggf. ein- oder mehrfach mit R⁴ substituiert sein können,

-mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁...₆-Alkyl, -N(C₁...₆-Alkyl)₂, -NHC₆...₁₄Aryl, -N(C₆...₁₄Aryl)₂, -N(C₁...₆Alkyl)(C₆...₁₄Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁...₆-Alkyl, -O-C₆...₁₄-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C₁...₆-Alkyl, -S-C₆...₁₄Aryl, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁...₆Alkyl, -OSO₂C₆...₁₄Aryl, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, wobei die C₆...₁₄Aryl-Gruppen und die eingeschlossenen carbocyclischen und heterocyclischen Substituenten ihrerseits ggf. ein- oder mehrfach mit R⁴ substituiert sein können,

-carbo- oder heterocyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Spirocyclen mit 3...10 Ringgliedern, wobei heterocyclische Systeme 1...6 Heteroatome enthalten, die vorzugsweise N, O und S sind, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁...₆-Alkyl, -N(C₁...₆-Alkyl)₂, -NHC₆...₁₄Aryl, -N(C₆...₁₄Aryl)₂, -N(C₁...₆Alkyl)(C₆...₁₄Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁...₆-Alkyl, -O-C₆...₁₄-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C₁...₆-Alkyl, -S-C₆...₁₄Aryl, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁...₆Alkyl, -OSO₂C₆...₁₄Aryl, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern, mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind, wobei die C₆...₁₄Aryl-Gruppen und die eingeschlossenen carbocyclischen und heterocyclischen Substituenten ihrerseits ggf. ein- oder mehrfach mit R⁴ substituiert sein können,

steht, wobei R¹ und R⁵ gleich oder verschieden sein können

R², R³ können Wasserstoff oder -OH sein, wobei mindestens einer von beiden Substituenten -OH sein muß;

R⁴ steht für -H, -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁...₆-Alkyl, -N(C₁...₆-Alkyl)₂, -NHC₆...₁₄Aryl, -N(C₆...₁₄Aryl)₂, -N(C₁...₆Alkyl)(C₆...₁₄Aryl), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -COOH, -(CO)R⁶, -(CS)R⁶, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁...₆-Alkyl, -O-C₆...₁₄-Aryl, -O(CO)R⁶, -S-C₁...₆-Alkyl, -S-C₆...₁₄Aryl, -SOR⁶, -SO₂R⁶;

R⁶ kann -H, -NH₂, -NHC₁...₆-Alkyl, -N(C₁...₆-Alkyl)₂, -NHC₆...₁₄Aryl, -N(C₆...₁₄Aryl)₂, -N(C₁...₆Alkyl)(C₆...₁₄Aryl), -O-C₁...₆-Alkyl, -O-C₆...₁₄-Aryl, -S-C₁...₆-Alkyl, -S-C₆...₁₄Aryl, -C₁...₁₂-Alkyl, geradkettig oder verzweigt, -C₁...₁₂-Alkenyl, ein oder mehrfach ungesättigt, geradkettig oder verzweigt, -mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Carbocyclen mit 3...14 Ringgliedern,

-mono-, bi- oder tricyclische gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte Heterocyclen mit 5...15 Ringgliedern und 1...6 Heteroatomen, die vorzugsweise N, O und S sind.

DE 198 18 964 A 1

Verdünnungsmitteln beziehungsweise sonstigen Hilfsstoffen zu pharmazeutischen Zubereitungen verarbeitet beziehungsweise in eine therapeutisch anwendbare Form gebracht werden

13. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel 1 gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 und/oder von pharmazeutischen Zubereitungen nach den Ansprüchen 11 und 12 allein oder in Kombination untereinander oder in Kombination mit Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln beziehungsweise sonstigen Hilfsstoffen.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65